

【総 説】

## 二光子顕微鏡を用いた脳循環イメージング

堀田 晴美

東京都健康長寿医療センター研究所 老化脳神経科学研究チーム 自律神経機能

### 要約

認知機能に重要とされる前脳基底部マイネルト核の刺激は、血圧や脳代謝に影響を与えずに、新皮質の血流を著しく増加させる。しかし、これまで脳実質内の動脈の反応を *in vivo* で直接観察することは困難であり、新皮質内部のどの深さにあるどのような血管が拡張して血流増加をもたらすかはわかっていなかった。我々は、近年開発された二光子顕微鏡を用いる事により、マウス前頭葉新皮質実質内の動脈を脳表から  $800\mu\text{m}$  の深さ (V 層中央部) までイメージングし、マイネルト核の電気刺激と高炭酸ガス刺激による直径の変化を調べた。その結果、マイネルト核の活性化によって新皮質層特異的な、特有の動脈拡張反応が起こることを見出した。この反応は、動脈自体の性質の違いではなく、マイネルト核からのコリン作動性投射密度の違いに基づく反応らしい。

キーワード: Cerebral blood flow, cerebral artery, nucleus basalis of Meynert, cortical layers, two-photon microscopy

### 1. はじめに

我が国の人口における高齢者 (65 歳以上) の割合は、現在 4 人に 1 人であり、約 30 年後には 3 人に 1 人に増えると推定されている。高齢になっても認知症にならず、自分の身の回りのことは自分でできる程度の健康状態でいたいものである。しかし現在、高齢者の 4 人に 1 人が認知症、あるいはその“予備軍”とされる軽度認知機能障害 (MCI)、に陥っているという。神経の活動に必要な酸素やグルコースは血流によって脳へ送られる。我々は、脳機能を支える脳血流の調節に着目し、認知症予防に向けた基礎研究を行なっている。

脳血管は、炭酸ガス負荷により著しく拡張することがよく知られているが、神経性にも調節される。例えば、脳血管には交感神経アドレナリン作動性線維や副交感神経コリン作動性線維が分布する。これらの自律神経線維は、末梢にある自律神経節に細胞体を持ち、脳の外側から脳表の血管に分布し、脳表血管の直径を変化させることが古くから知られている [1,2]。一方、脳内に細胞体を持つ内因性神経線維 (マイネルト核からのコリン作動性線維や青斑核からのアドレナリン作動性線維) は脳実質内の血管に分布し、脳表血管の直径には影響を与え

ない [3,4]。内因性コリン作動性神経は認知機能に欠かせない役割を果たす。当研究室では、認知機能に重要なマイネルト核が脳血流調節に関与することを示してきた [1,5,6]。しかし、これまで脳実質内の血管の反応を *in vivo* で直接観察することは困難であったため、新皮質内部のどの深さにあるどのような血管が拡張して血流増加をもたらすかはわかっていなかった。我々は、最近開発された顕微鏡を用いる事により、マイネルト核刺激による前頭葉皮質実質内の動脈反応をはじめ明らかにした [7]。本稿では、我々の最近の研究を中心に、内因性コリン作動性神経による新皮質血管の調節についての知見を紹介する。

### 2. 内因性コリン作動性神経による脳血流調節

前脳基底部マイネルト核に起始するコリン作動系の賦活によって、新皮質血流が顕著に増加する。この反応は、全身動脈圧の変化を伴わず、血液脳関門の内側にあるムスカリンおよびニコチン性コリン作動性受容体の活性化を介する [8,9]。また、麻酔下と無麻酔下のいずれにおいても、新皮質グルコース代謝の変化とは無関係に起こる [10,11]。前脳基底部刺激中に一過性脳動脈閉塞を行うと、刺激しない場合に比べて大脳皮質における遅発性ニューロン死が抑制される [12]。したがって、前脳基底部から新皮質へのコリン作動性線維投射が新皮質血管の調節に積極的な役割を持ち、その賦活は虚血による障害から新皮質ニューロンを保護するのに役立つと考えられる。

前脳基底部コリン作動性領域の刺激で引き起こされる新皮質局所血流の反応は、赤血球の動きによるレーザー

連絡先: 〒 173-0015

東京都板橋区栄町 35-2

TEL: 03-3964-3241 (内線 4343)

FAX: 03-3579-4776

E-mail: hhotta@tmig.or.jp

光散乱に基づく方法（レーザー・ドップラー法やレーザー・スペックル法）や、血漿成分の組織拡散に基づく方法（[14C]iodoantipyrine 法、ヘリウムクリアランス法）で測定されてきた [8,9,13,14]。いずれの方法でも、刺激側の新皮質の広範な領域（前頭葉、頭頂葉、後頭葉）の血流が特異的に増加することが示されている [9,13]（図 1）。

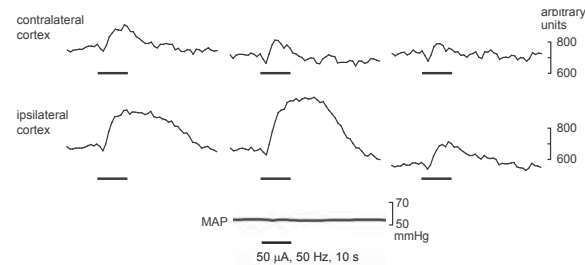


図 1. 一側マイネルト核刺激による新皮質の各領域における脳血流反応（文献 [9] より改変）

### 3. 新しい顕微鏡技術を用いた新皮質内部の血管の観察

二光子励起顕微鏡は、組織透過性に優れた長波長のレーザーを用い、2つの光子の焦点面のみで励起光をごく短時間発生させ、深部の顕微鏡像を低侵襲にて取得する。従って、in vivo の状態で、これまで不可能であった深部のリアルタイムでの血管の形態観察を可能にした。我々は二光子励起顕微鏡を用い、in vivo で異なる深さで大脳皮質内部の動脈の反応を調べた [7]（図 2）。マウス前頭葉に、血管観察用の閉鎖頭窓 [15] とマイネルト核刺激用の電極を埋め込み、ウレタン麻醉下で呼吸と体温を生理的に維持してイメージング実験を行った。血管の可視化のため、蛍光物質（rhodamine-dextran, 分

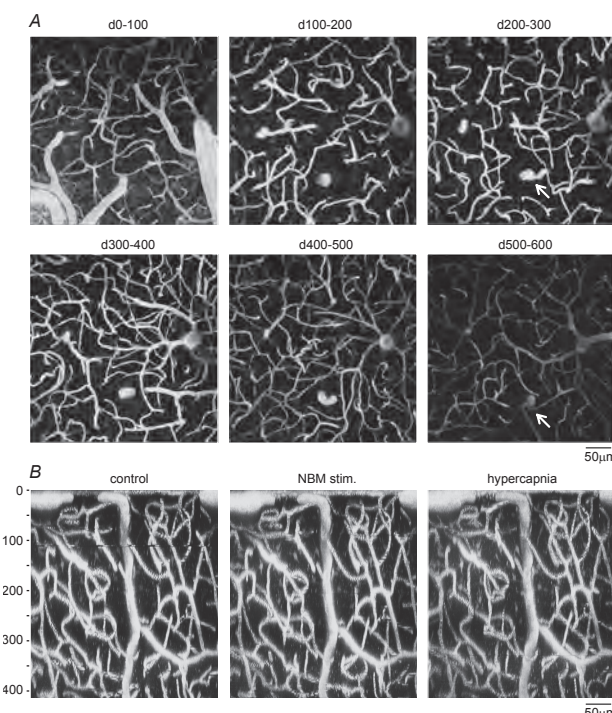


図 2. 大脳皮質血管像（文献 [7] より改変）

子量 7 万) を静脈内投与して血漿を標識し、二光子励起顕微鏡を使って蛍光物質を 900 nm の波長で励起した。脳表面の軟膜動脈から分枝して垂直に大脳皮質内部に進入する「穿通動脈」とよばれる動脈を追跡し、画像解析ソフトウェアを使って動脈の内径を定量的に測定した [16]。最も深くて 800  $\mu\text{m}$  まで追跡できた。マウスの前頭葉の厚さ約 1,400  $\mu\text{m}$  の全ての観察には至らないものの、I 層から V 層の中央部に相当する領域について観察できた。

### 4. 炭酸ガスによる脳血管拡張反応の特徴

マウスの脳血管の状態が正常であることを確認するため、はじめに脳血管拡張作用のあることが良く知られている炭酸ガス刺激（3%炭酸ガス吸入）の影響を調べた。その結果、炭酸ガス刺激中には、脳表血管を含め、調べた全層において穿通動脈直径が顕著に増加することが明らかとなった（図 3）。測定した穿通動脈の直径は、安静時においては深さにより異なっていたが、炭酸ガス刺激中にはいずれの深さにおいても一定のレベルまで拡大する傾向があった。そのため、直径の増加率は、安静時の基礎直径の小さい 400-500  $\mu\text{m}$  の深さにおいて約 25%と、最も大きな反応を示した。脳表から 300  $\mu\text{m}$  の深さまでは同程度（10 - 12%）の拡張が見られた。

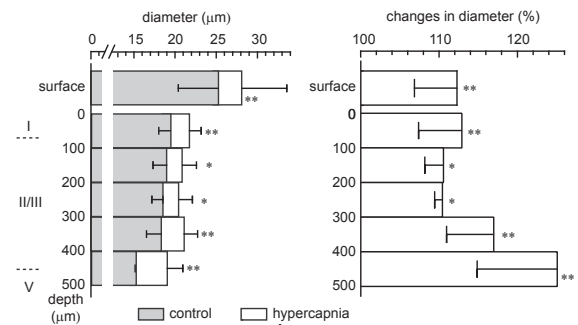


図 3. 高炭酸ガス刺激による前頭葉の各深さにおける脳動脈反応（文献 [7] より改変）

### 5. 内因性コリン作動性神経による脳内部の血管拡張の証明

マイネルト核刺激（30-50  $\mu\text{A}$ , 0.5 ms, 50 Hz）による血管径の増加は、新皮質表面の軟膜動脈ではごく僅かであった。この結果は、マイネルト核刺激による新皮質実質内血流の著しい増加が、脳表動脈の変化を伴わずに起こることから、新皮質内部で血管拡張が起こることを示唆した Adachi らの結果 [4] と一致する。しかし、そこから分枝した穿通動脈は、表面からわずか 50  $\mu\text{m}$  下の新皮質第 I 層において、顕著な拡張反応を示したのである（図 4）。技術の進歩により、仮説が証明されたわけである。さらに、予想を超える精密な血管調節が明らかとなった。それは下記のように、穿通動脈の反応が、新皮質の層構造に依存して異なっていたことである。

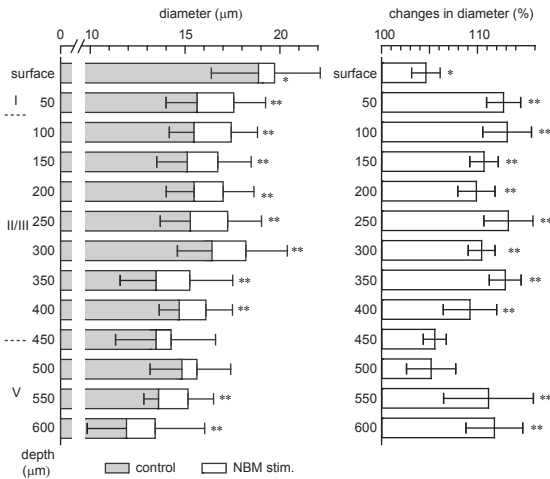


図4. マイネルト核刺激による前頭葉の各深さにおける脳動脈反応 (文献 [7] より改変)

#### 6. 内因性コリン作動性神経による層特異的な血管反応

新皮質の上層 50-400  $\mu\text{m}$  (I-III 層) および 550-600  $\mu\text{m}$  の深さ (V 層中央部) において、マイネルト核刺激中に、血管径が 9%—13% 増加した。しかし、深さ 450 と 500  $\mu\text{m}$  (V 層上部) では有意な変化がなかった (図 4)。マイネルト核からの神経線維終末は、前頭葉皮質の I-III および VI 層で特に高密度に分布する [17,18] ことから、上記マイネルト核刺激による動脈反応の層特異性は、マイネルト核からの神経線維終末の分布密度と一致するといえる。また、マイネルト核刺激による動脈反応の層特異性が炭酸ガス吸入刺激によるものとは異なっていたことから、マイネルト核刺激に対する動脈反応の層特異性がこのシステムに特有であって皮質の血管反応性自体の差によるわけではないことが明らかである。従って、マイネルト核の活性化は、そこから投射するコリン作動性線維密度の差により、新皮質層構造特異的な穿通動脈の拡張を誘発すると考えられる。

マイネルト核刺激による直径変化の時間経過も、上層および下層で異なっていた。上層 (I-III 層) ではマイネルト核刺激開始 1 秒以内に直径が増大し始めたが、下層 (V 層) ではそれより遅かった。同じマイネルト核刺激で誘発される血流反応 (レーザー・スペックル法で測定) [9] と比較すると、上層での直径の増加は、開始潜時は 1 秒以上、ピーク潜時は 5 秒以上血流反応に先行した (図 5)。従って、マイネルト核刺激による穿通動脈上層での血管拡張が、血流増加をもたらす直接の原因と考えられる。

マイネルト核刺激による穿通動脈径の変化の大きさは、組織学的に測定された皮質表面より下 60  $\mu\text{m}$  の実質内の微小血管の平均直径の増加の大きさ [19] と一致した。今回の解像度では、毛細血管の直径変化を評価する事は不可能であり、マイネルト核刺激による毛細血管の反応の時間経過はまだ不明である。しかし、穿通動脈の反応が下層よりも上層で早かったことから、多くの組織を灌流する上層での穿通動脈拡張が毛細血管の受動的拡張を起こすと予想できる。脳血流増加反応は、マイネ

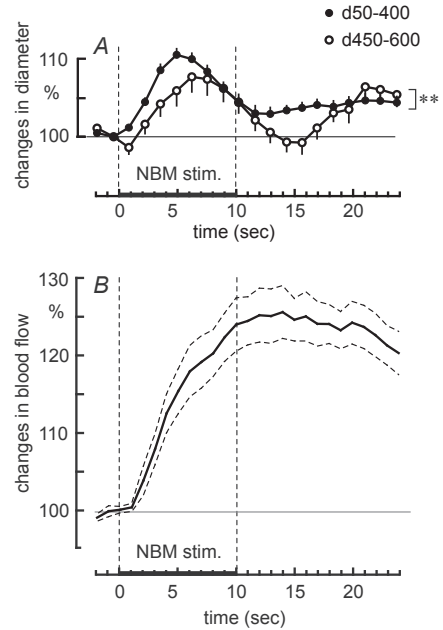


図5. マイネルト核刺激による前頭葉の血管反応 (A) と脳動脈反応 (B) (文献 [7] より改変)

ルト核刺激によって新皮質の広い領域でおこなることがわかっている [9,13] が、前頭葉以外の皮質領域についても穿通動脈反応の層特異性を明らかにする必要がある。

#### 7. おわりに

以上述べたように、マイネルト核の賦活は新皮質表面の軟膜動脈にはあまり影響を与えずに、実質内の穿通動脈を拡張させ、それによって著しい脳血流増加をもたらす。穿通動脈の拡張には深さ特異性がある。マイネルト核の活性化は、そこから投射するコリン作動性線維密度の差により、新皮質の層構造特異的な穿通動脈の拡張を誘発するらしい。

認知機能には新皮質とそこに投射するコリン作動性線維が欠かせない役割を果たすことが知られている。新皮質実質内のコリン作動性線維は、主に前脳基部コリン作動性領域からの投射線維である。前脳基部から新皮質や海馬に投射するコリン作動性神経は、アルツハイマー型認知症では著しく減少する。そして、前脳基部ニューロン数減少の程度と認知機能低下の程度がアルツハイマー型認知症をはじめ、認知機能障害の見られる様々な疾患 (パーキンソン病やアルコール依存症など) において相関する [20]。脳血流も、新皮質や海馬において、認知症の進行に伴い著しく低下する。新皮質が VI 層構造であることは古くから知られているが、この構造と認知機能との関係は必ずしもよくわかっていない。しかし正常老化では VI 層構造を維持しつつバランスよく萎縮するのに対し、アルツハイマー病では層特異的なニューロン脱落が II 層と III 層でおこなることが病理学的に報告されている [21]。

マイネルト核刺激による層特異的な穿通動脈反応は、おそらく新皮質機能円柱に、空間的に特異な血流増加をもたらすと思われるが、それが認知機能にとってどのよ

うな意味を持つ興味深い。ニューロン機能についても、新皮質層特異的な活動を二光子励起顕微鏡を用いて検討した報告が最近になり散見される [22]。近い将来、神経・グリア・血管の新皮質層特異的活動の生理的意義の全体像が明らかにされるものと、期待される。マイネルト核の層構造特異的な血管調節と、アルツハイマー病で見られる新皮質の層構造特異的な萎縮 [21] との間に、なんらかの関係があり、脳血流の不足が脳の病態を招くのみならず、層特異的な精緻な脳血管反応が正常な認知機能を支えているのかもしれない。認知症治療薬ドネペジルは、アセチルコリンを分解する酵素の働きを阻害することで脳内のアセチルコリン濃度を高め、アルツハイマー病の認知機能低下症状を改善する薬である。ドネペジル治療によりアルツハイマー病患者の大脳皮質血流が改善されることを示す報告 [23] が、近年多数発表されている。ドネペジルによる脳内のアセチルコリン濃度の増加は、コリン作動性シナプスにおいて生じると考えられるため、マイネルト核刺激と同様の動脈反応を誘発する可能性がある。非選択的に脳血管を拡張させる血管拡張薬ではなく、我々が明らかにしたような層特異的な血管反応をもたらすような薬物が認知機能改善に有効である可能性がある。我々の研究成果は、認知機能改善薬開発のスクリーニングに役立つかもしれない。

脳循環は、臨床において重要であるにもかかわらず、基礎研究は限られている。近年目覚ましい進歩をとげつつある新技術を駆使した基礎研究が今後ますます重要となる。

#### 参考文献

1. Sato A, Sato Y. Cholinergic neural regulation of regional cerebral blood flow. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9:28-38, 1995.
2. 田中耕太郎 脳血管の収縮神経と拡張神経. *Clinical Neuroscience* 14:740-743, 1996.
3. Ohta K, Gotoh F, Shimazu K, et al. Locus coeruleus stimulation exerts different influences on the dynamic changes of cerebral pial and intraparenchymal vessels. *Neurol Res* 13:164-167, 1991.
4. Adachi T, Baramidze DG, Sato A. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases cortical cerebral blood flow without influencing diameter of the pial artery in rats. *Neurosci Lett* 143:173-176, 1992.
5. 堀田晴美 新皮質や海馬の血流を増やす神経性血管拡張系はニューロン保護に重要か? *基礎老化研究* 25 (2):83-88, 2001.
6. Hotta H, Uchida S. Aging of the autonomic nervous system and possible improvements in autonomic activity using somatic afferent stimulation. *Geriatr Gerontol Int.* 10 Suppl 1:S127-136, 2010.
7. Hotta H, Masamoto K, Uchida S, et al. Layer-specific dilation of penetrating arteries induced by stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the mouse frontal cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, in press
8. Biesold D, Inanami O, Sato A, et al. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases cerebral cortical blood flow in rats. *Neurosci Lett* 98:39-44, 1989.
9. Hotta H, Uchida S, Kagitani F, et al. Control of cerebral cortical blood flow by stimulation of basal forebrain cholinergic areas in mice. *J Physiol Sci* 61:201-209, 2011.
10. Kimura A, Sato A, Takano Y. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert does not influence glucose utilization of the cerebral cortex in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 119:101-104, 1990.
11. Vaucher E, Borredon J, Bonvento G, et al. Autoradiographic evidence for flow-metabolism uncoupling during stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the conscious rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:686-694, 1997.
12. Hotta H, Uchida S, Kagitani F. Effects of stimulating the nucleus basalis of Meynert on blood flow and delayed neuronal death following transient ischemia in the rat cerebral cortex. *Jpn J Physiol* 52:383-393, 2002.
13. Adachi T, Inanami O, Ohno K, et al. Responses of regional cerebral blood flow following focal electrical stimulation of the nucleus basalis of Meynert and the medial septum using the [14C] iodoantipyrine method in rats. *Neurosci Lett* 112:263-268, 1990.
14. Lacombe P, Sercombe R, Verrecchia C, et al. Cortical blood flow increases induced by stimulation of the substantia innominata in the unanesthetized rat. *Brain Res* 491:1-14, 1989.
15. Tomita Y, Kubis N, Calando Y, et al. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:858-867, 2005.
16. Sekiguchi Y, Masamoto K, Takuwa H, et al. Measuring the vascular diameter of brain surface and parenchymal arteries in awake mouse. *Adv Exp Med Biol* 789:419-425, 2013.
17. Luiten PG, Gaykema RP, Traber J, et al. Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain Res* 413:229-250, 1987.
18. Rotolo T, Smallwood PM, Williams J, et al. Genetically-directed, cell type-specific sparse labeling for the analysis of neuronal morphology. *PLoS One* 3:e4099, 2008.

19. Hotta H, Kanai C, Uchida S, et al. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases diameter of the parenchymal blood vessels in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 358:103-106, 2004.
20. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555-563, 2011.
21. 水谷俊雄 脳の老化とアルツハイマー病. 岩波書店, 1994.
22. Alitto HJ, Dan Y. Cell-type-specific modulation of neocortical activity by basal forebrain input. *Front Syst Neurosci* 6:79, 2012.
23. Nakano S, Asada T, Matsuda H, et al. Donepezil hydrochloride preserves regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 42: 1441-1445, 2001.

## Imaging of cerebral circulation by means of two-photon microscopy

Harumi Hotta

Department of Autonomic Neuroscience, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

It has been shown that activating the cholinergic fibers in the cerebral cortex from the nucleus basalis of Meynert (NBM) produces a remarkable increase in cerebral blood flow in the cortex, independently of changes in the cortical metabolism. Direct observation of changes in the diameter of cerebral arteries in vivo has been limited to the cortical surface, so that the type of parenchymal blood vessel that dilates to produce an increase in regional cortical blood flow during stimulation of the NBM has not been determined. We used a newly developed imaging technique, two-photon microscopy, to examine responses of penetrating arteries in the mouse frontal cortex in vivo at different cortical depths. We compared diameter changes induced by electrical stimulation of the NBM and by hypercapnia. Our results show that stimulation of the NBM produces dilation of penetrating arteries of the cerebral cortex in a layer-specific manner, which was distinct from that during hypercapnia. These findings indicate that the layer-specific dilation of penetrating arteries represent a layer specificity of cholinergic nerve terminals from the NBM.

Key words : Cerebral blood flow, cerebral artery, nucleus basalis of Meynert, cortical layers, two-photon microscopy